

# Cirkulirajuće tumorske stanice – pogled u budućnost

## Circulating tumor cells – A window into the near future

Arnela Redžović\*, Sanja Pavlović, Renata Dobrila-Dintinjana

Klinika za radioterapiju i onkologiju,  
KBC Rijeka, Rijeka

Primljeno: 11. 2. 2015.

Prihvaćeno: 25. 4. 2015.

**Sažetak.** Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) najvjerojatnije imaju ključnu ulogu u posredovanju nastanka metastaza. CTC-i putuju kroz krvotok i limfni sustav. Hipoteze današnjih istraživanja jesu da CTC-i idu na udaljena mjesta u različite organe i tkiva. Moraju preživjeti u stranom mikrokolištu a zatim se razmnožavaju, čime se stvaraju mikroskopske, potom makroskopske, a potom i kliničke značajne neoplastične izrasline.

**Ključne riječi:** biopsija; cirkulirajuće tumorske stanice; tumorske stanice

**Abstract.** Circulating tumor cells (CTC) most likely play a key role in mediating the formation metastasis. CTCs travel through the blood stream and lymphatic system. Today Hypotheses of many researches are that CTCs will go to distant places in different organs and tissues. They have to survive in a foreign microenvironment and then proliferate, thus creating a microscopic than macroscopic, and then clinically significant neoplastic growths.

**Key words:** biopsy; circulating tumor cells; tumor cells

**\*Dopisni autor:**

Dr. sc. Arnela Redžović, dr. med.

Klinika za radioterapiju i onkologiju

KBC Rijeka, Krešimirova 42, 51 000 Rijeka

e-mail: redzovica@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Karcinomi su vrlo heterogena tkiva sastavljena od histološki različitih stanica. Osim neoplastičnih stanica (maligno promijenjenih) u ili oko tumorala nalaze se i epitelne stanice, tj. nemaligne stanice te tumorski promijenjen mikrookoliš (izvanstanični matriks). Složena međudjelovanja između stanica i mikrookoliša dovode do toga da tumorske stanice dobivaju prednost u napredovanju, rastu i proliferaciji. Opstanak tumora stoga ovisi o sposobnosti da karcinom kontrolira i oblikuje okolni mikrookoliš<sup>1</sup>. Metastaze su glavni uzrok smrti pacijenata sa solidnim tumorima. Hematogeno širenje tumorskih stanica drži se ključnim korakom u metastaziranju tumora, stoga bi određivanje tumorskih stanica u perifernoj krvi onkoloških pacijenata moglo imati prognostički značaj i vrijednost pri praćenju terapije<sup>1</sup>.

## CIRKULIRAJUĆE TUMORSKE STANICE – POVIJESNI PREGLED

Prisutnost tumorskih stanica u perifernoj cirkulaciji po prvi put opisao je 1869. god. Thomas Ashworth. Od tada o postojanju, podrijetlu i kliničkom značaju cirkulirajućih tumorskih stanica (engl. *circulating tumor cells*; CTC) naširoko se raspravljalo. U kasnim 1970-ima uvođenje osjetljivih i specifičnih imunohistokemijskih tehnika dovelo je do ponovnog zanimanja za tu temu otkrivanjem CTC-a i njihove moguće povezanosti s početkom metastaziranja solidnih malignih bolesti. No nedostatak osjetljivih metode izoliranja u ranim stadijima bolesti CTC-a bio je poticaj na otkrivanje diseminiranih tumorskih stanica (DTC) u koštanoj srži. Koštana srž je dostupna punkciji (prsna i zdjelična kost) te predstavlja najčešći organ za detekciju DTC-a podrijetlom iz različitih tumora i time najistaknutiji pokazatelj minimalne ostatne maligne bolesti.

DTC su otkrivene u koštanoj srži u 30 – 40 %<sup>2</sup> pacijenata s karcinomom dojke te je njihova prisutnost povezana s lošom prognozom. Novije studije govore u prilog malom postotku DTC-a (oko 3 %) u koštanoj srži. Iako je prisutnost DTC-a u tih pacijenata značajan prognostički čimbenik u predviđanju ishoda, niska stopa DTC-a dovodi u pitanje vrijednost rutinske uporabe izolacijskih metoda (samo u vrlo selekcionirane skupine pacijenata?).

Biopsija koštane srži invazivna je metoda koju karakterizira viši stupanj nuspojava i mortaliteta te veći troškovi od jednostavne analize periferne krvi, stoga su daljnja istraživanja bila usmjerena na istraživanje CTC-a u perifernoj krvi<sup>2,3</sup>.

Koncept intravaskularnog širenja tumorskih stanica široko je prihvaćen. CTC-i predstavljaju tumorske stanice u krvotoku koje naviru iz primarnog tumora. Jedno od najčešćih mjesta gdje odlaze CTC-i su kosti gdje se nalaze i DTC-i od kojih su ove potekle (koje su u stanju „mirovanja“). Ne

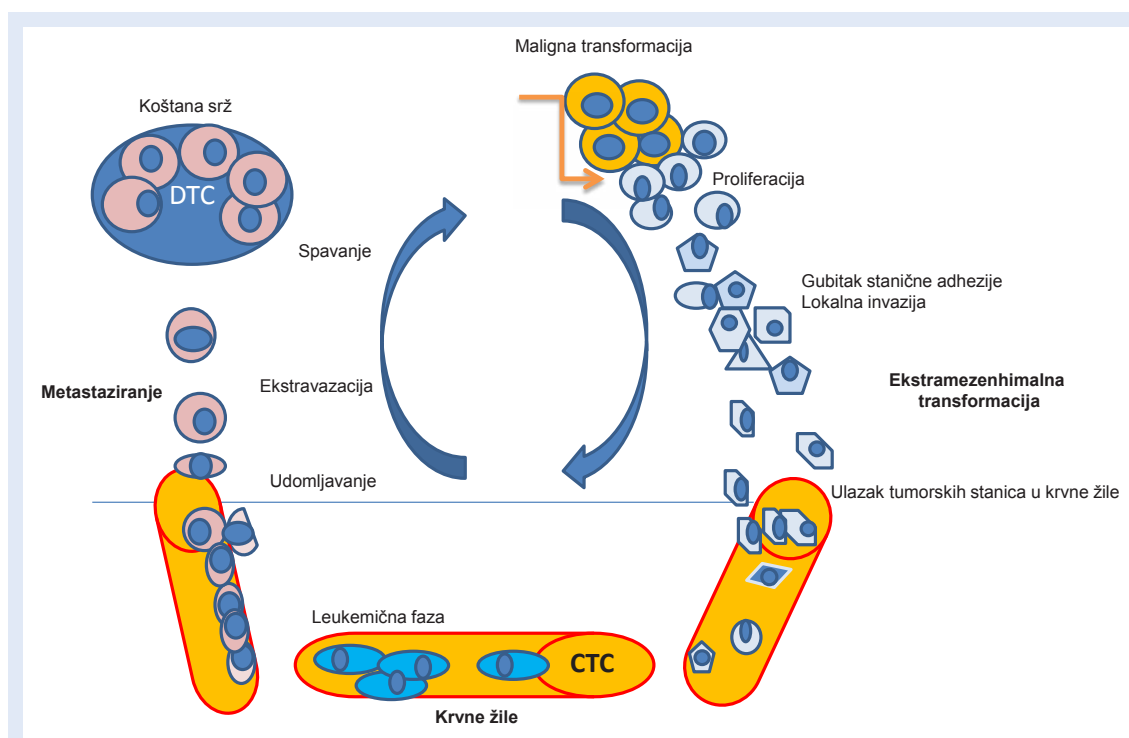
Metastaze su glavni uzrok smrti pacijenata sa solidnim tumorima. Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) znak su progresije većine epitelnih tumora, uključujući karcinom dojke, prostate, jajnika, pluća, bubrega te kolorektalni karcinom.

zna se što izaziva „izlazak“ iz mirovanja te promjenu CTC-a iz epitelnog u mezenhimalni fenotip. Mezenhimalni fenotip podržava tumorsku pokretljivost, proliferaciju i rast<sup>13</sup>. CTC-i su stoga znak progresije većine epitelnih tumora, uključujući karcinom dojke, prostate, jajnika, pluća, bubrega te kolorektalnog karcinoma (slika 1). CTC-i predstavljaju autodiseminacija tumora od ali i prema primarnom tumoru te na taj način povećavaju njihovu agresivnost<sup>4,5</sup>.

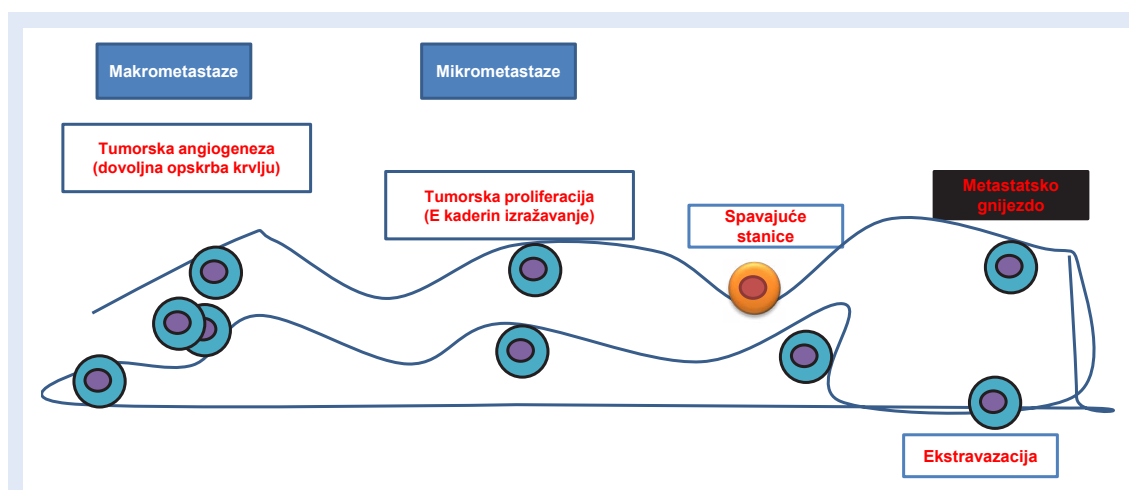
## METODE IZOLACIJE CTC-A

Prisutnost CTC-a u krvi (koje su primarno podrijetla iz epitelnih malignih bolesti i imaju epitelne biljege) pruža jedinstvenu priliku da se uzorak tkiva karcinoma dobije putem manje invazivne metode tzv. „tekuće biopsije“. Pronađeno je više metoda izolacije CTC-a: metode citometrije (na temelju toga da CTC-i izražavaju epitelni marker), molekularne analize (metoda reverzne transkripcije – lančane reakcije polimerazom); CellSearch™ sustav (Veridex, Raritan, NJ, USA).

Nije još jasno kako optimalno kvantificirati i karakterizirati CTC-e jer CTC-i dijelovi samog tumora jesu heterogene skupine stanica. Bitno je naglasiti da primarni tumor nije istih bioloških obilježja kao metastaze, stoga se nada polaže u CTC-e da posluže za njihovu bolju karakterizaciju. Poznat je primjer da se imunohistokemijski profil karcinoma



**Slika 1.** Metastatski ciklus (modificirano prema ref. 13)



**Slika 2.** Recipročno međudjelovanje malignih stanica i intravaskularnog i mikrometastatskog okoliša. Uspostavljanje metastaza ovisi o preživljenju CTC-a (modificirano prema ref. 3)

dojke može promijeniti tijekom bolesti, te je dokazan značajan nesklad u statusu estrogenskih receptora (ER) i receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor*; HER2). "Tekuća biopsija" stoga predstavlja atraktivnu alternativu invazivnoj biopsiji<sup>6</sup>. CTC-i u pacijenata s metastatskim karcinomom prostate i dojke izražavaju i markere citokeratina, adhezijskih molekula (E-kaderina), vimentina i N-kaderina. Stoga, neovisno o tome što su primar-

ni tumori epitelnog podrijetla, CTC-i mogu imati djelomičnu i mezenhimalni fenotip. Preko fenotipa CTC-a predmnijeva se i put metastaziranja i širenja samog tumora<sup>5-6</sup>. Nekoliko studija analiziralo je genetska odstupanja između CTC-a i primarnog tumora, pokušavajući povezati neke mutacije s agresivnosti i odgovorom na liječenje (slika 2). Trenutno nekoliko kliničkih ispitivanja istražuje nove ciljane strategije na temelju ekspresije genskog profila CTC-a<sup>5,6</sup>.

## KLINIČKI ZNAČAJ CTC-A

Postoje brojni dokazi o tome da CTC vrijednosti koreliraju s ukupnim preživljenjem pacijenata te razdobljem bez bolesti (engl. *progression free-survival*; PFS), stoga su CTC-i dobri terapijski pokazatelj, osobito kod metastatskog karcinoma dojke, prostate i debelog crijeva, što potvrđuju i brojne studije koje sugeriraju da se CTC-i mogu koristiti i za praćenje i za određivanje terapijske učinkovitosti<sup>7</sup>. Primjerice, u metastatskom karcinomu dojke pacijentice s  $\geq 5$  CTC-a / 7,5 ml 3 – 5 tjedana nakon kemoterapije i hormonske terapije imaju kraći PFS od pacijentica s  $< 5$  CTC-a / 7,5 ml<sup>9</sup>. Prema tome, vrijednost CTC-a mogu se koristiti kao dodatak uobičajenim postupcima za praćenje stanja bolesti i učinkovitosti terapije<sup>7</sup>.

Pacijenti s karcinom ne-malih stanica pluća koji su dobili bioterapiju (erlotinib), a imali su CTC-a  $\geq 5$  CTC-a / 7,5 ml na početku znatno su bolje odgovorili od pacijenata s  $< 5$  CTC / 7,5 na navedenu terapiju, ali je preživljenje onih s manje CTC-a duže. Uz terapiju došlo je do pada broja CTC-a. Za kastracijski rezistentan karcinom prostate vrijednost CTC-a ima prognostičko značenje prije primjene terapije. Promjene broja CTC-a kod njih imaju i prediktivni značaj. Pacijenti koji imaju manje CTC-a prije početka kemoterapije imaju puno bolje preživljavanje. Ako CTC ostane povišen nakon jednog ciklusa kemoterapije, to označava znatno lošije preživljenje, što je utvrđeno i kod karcinoma dojke<sup>8</sup>. CTC kvantifikacija i karakterizacija mogu stoga biti potencijalni biomarkeri tijekom bolesti i odgovora na terapiju te mogu imati i ulogu u kliničkom razvoju novih lijekova<sup>8,9</sup>.

Uloga CTC-a u probiru raka dojke i otkrivanju recidiva trenutačno je ograničena. Daljnji razvoj tehnike bit će ključan u povećanju široke primjenjivosti CTC-a i unapređenja polja personalizirane terapije raka dojke<sup>10</sup>.

Da bi nam CTC-i služili kao vrijedan biomarker, nužno je provesti studije koje će uspoređivati standardne kliničke/radiološke nalaze s kvantitativnim nalazima CTC-a. Mali broj CTC-a je restriktivni čimbenik za rutinsku kliničku upotrebu<sup>11,12</sup>. Nadalje, rutinsku kliničku uporabu CTC-a ograničava i činjenica da su opisani pacijenti/ce s karcinomom dojke, koji ni nakon 20 godina od utvrđivanja CTC-a u krvi nisu razvile metastatsku bolest dojke. I ne

samo to: kako ćemo interpretirati nalaze pozitivnih CTC-a u pacijenata koji imaju dva karcinoma?

Oba mogu dati diseminaciju bolesti? Na ta, ali i na mnoga druga pitanja odgovore će dati ciljane studije koje će svakako omogućiti rasvjetljavanje biologije raka i procesa metastaziranja<sup>12</sup>.

## ZAKLJUČAK

Utvrđivanje broja CTC-a i njihovih karakteristika značajno je za otkrivanje biologije metastatskih

„Tekuća biopsija” predstavlja atraktivnu dijagnostičku alternativu. Kvantifikacija i karakterizacija CTC-a omogućit će njihovu upotrebu kao biomarkera.

karcinoma (dojke, prostate, debelog crijeva i raka pluća). Istraživanja u ranim fazama tumora još uvijek su u velikoj mjeri neostvorena te zahtijevaju osjetljivije i lakše ponovljive tehnologije. „Real-time biopsija” trenutno je najvjerojatniji domet u istraživanjima CTC-a. Ako znamo da prisutnost CTC-a tijekom terapije označava rezistenciju na tu terapiju, hoćemo li prekinuti škodljiv i skup, a nekoristan postupak<sup>12</sup>? Buduća istraživanja dat će odgovor na ta i druga pitanja, a vjerojatno i omogućiti razvoj jednostavnog testa iz krvi kojim će se profilirati tumor u svakog pacijenta, odrediti ciljevi liječenja i praćenje pacijenta, tj. bit će u potpunosti omogućena personalizirana onkološka medicina<sup>11</sup>.

**Izjava o sukobu interesa:** Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

## LITERATURA

1. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:839-84.
2. Cichon MA, Degnim AC, Visscher DW, Radisky DC. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:389-97.
3. Meseure D, Drak Alsibai K, Nicolas A. Pivotal role of pervasive neoplastic and stromal cells reprogramming in circulating tumor cells dissemination and metastatic colonization. *Cancer Microenviron* 2014;7:95-115.
4. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009;139:1315-26.
5. Stebbing J, Payne R, Reise J, Frampton AE, Avery M, Woodley L et al. The efficacy of lapatinib in metastatic

- breast cancer with HER2 non-amplified primary tumors and EGFR positive circulating tumor cells: a proof-of-concept study. *PLoS One* 2013;8:e62543.
6. Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Jiang JK, Lin CH. Dynamic changes in numbers and properties of circulating tumor cells and their potential applications. *Cancers (Basel)* 2014;6:2369-86.
7. Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB, Alix-Panabieres C, Janni W et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: Overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev* 2013;32: 179-88.
8. Danila DC, Morris MJ, de Bono JS, Ryan CJ, Denmeade SR, Smith MR et al. Phase II multicenter study of abiraterone acetate plus prednisone therapy in patients with docetaxel-treated castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1496-501.
9. De Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1995-2005.
10. Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Jiang JK, Lin CH. Dynamic changes in numbers and properties of circulating tumor cells and their potential applications. *Cancers (Basels)* 2014;6:2369-86.
11. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. *EMBO Mol Med. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO Mol Med* 2014;7:1-11.
12. Dobrila-Dintinjana R. Circulating Cancer Cells are Potential Weapon for Future Generations. *Hepato-Gastroenterology* 2014;61:5-8.
13. Schilling D, Todenhöfer T, Hennenlotter J, Schwentner C, Fehm T, Stenzl A. Isolated, disseminated and circulating tumour cells in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2012; 9:448-63.